

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10008

研究課題名(和文) ラミニン電着歯科金属インプラントと付着上皮の強固な生物学的封鎖を目指した基礎研究

研究課題名(英文) Fundamental research for strong biological sealing between laminin electrodeposition dental metal implant and adherent epithelium

研究代表者

中石 典子(寺田)(Nakaishi, Michiko)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・技術職員

研究者番号：60374550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラミニンをチタンへ電着固定化し、また、回転電極による流速環境で電着を行うことで、ラミニンに配向性が付与され、生体模倣の状態となる。この生体模倣の状態では金属を生物機能化させることを目的とした。ラミニンの電着固定化には、pH4の電解液、カソード電位を印可する直流電流が有効であり、電着時間には有意な差が認められなかった。回転電極によるラミニンの配向性は認められなかったが、固定化量の増加が観察された。しかしながら、電着固定化、配向性を制御するためにはより細かく厳密な条件決めが必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラミニンが一樣に、また、配向性をもってチタン表面に電着固定し、生体模倣の状態ではチタンが生物機能化されることを予想していたが、本研究では、ラミニンは凝集体として散在していた上、配向性が認められずに電着固定化されていた。しかしながら、より細かな条件でさらに研究を進めることで予想していた結果に近づける可能性もある。将来的には、ラミニンの工学的に汎用されている電着技術プロセスを生物学的に応用することのみならず、歯科から医科の領域にも応用できる可能性があり、将来的に広範に汎用できる技術を提供できる。

研究成果の概要(英文)：The electrodeposition of laminin to a titanium (Ti) surface and the orientation of laminin by a flow velocity using a rotating disk electrode becomes a biomimetics and makes metals biofunctionalization, is aim of this study. The adjusted pH4 electrolyte and the direct current to apply cathode potential is a very effective for the laminin electrodeposition to the titanium surface. And there was no significant difference in the electrodeposition time. There was not the orientation of laminin by a rotating disk electrode. The electrodeposition was increased. However, it is considered that the control of the electrodeposition and the orientation of laminin needs detailed and severe conditions.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：歯科金属インプラント ラミニン 電着 付着上皮 生物学的封鎖

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病菌に常に暴露されるという特異な口腔内環境では、時としてインプラントを予後不良に至らしめる。このような問題を解決する手段として、付着上皮の生物学的封鎖が挙げられる。

申請者の所属分野では、金属表面処理技術の一つ、電着にてチタン表面にアミン修飾ポリエチレングリコール<sup>[1]</sup>や双性イオンのコラーゲンを固定する方法を開発し、生体機能化に成功した<sup>[2]</sup>。この電着は、工業塗装分野で用いられる溶液浸漬での電気化学的表面処理で、汎用でありながら導電性をもつ金属材料全般に対して有効な上、均一な薄膜塗装が複雑な形状に対しても処理可能あり<sup>[3]</sup>、生体機能性を付与することができる。一方、インプラント側の歯肉の内側付着上皮には接着に必要な不可欠な双性イオンを有すラミニンが存在しない部分がある上、あっても限局的である。また、ターンオーバーも遅いため、感染防御や機械的刺激に対する抵抗性も弱く、上皮性封鎖が望めない。そこで、ラミニンをインプラント表面に生体模倣の状態で一様に電着固定させ、上皮全体でインプラントと接着させることができるのではないかと考えた。ラミニンを工学的に汎用されている電着にて金属に固定し、金属に生体機能化が備えれば、強固な生物学的封鎖が実現でき、インプラントの長期安定化が見込まれ、患者のQOLの向上に寄与できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、付着上皮の生物学的封鎖が強固なインプラント開発を最終ビジョンとし、申請者の所属分野における電着による金属生体機能化技術を応用することを目的とした。チタンに上皮細胞の接着に必須のラミニンを電着固定化し、分子トポロジー、結合状態、生体機能を学術的に検証する。本研究は、工学的に汎用されている電着技術プロセスを生物学的に応用することのみならず、歯科から医科への領域にも応用できる可能性があり、将来的に広範に汎用できる技術を提供できる至要性を有す。

## 3. 研究の方法

市販のJIS2種CP Ti板(10mm × 厚さ1.0mm)を鏡面研磨し、イソプロパノール、アセトンにて超音波洗浄した。ラミニン332を0.01v/w%となるよう0.9mass%NaCl水溶液に溶解した。溶液のpHを4、7、9に調整し、得られた溶液を電着用の0.01v/w%ラミニン含有電解液として使用した。電着は277K、対極には白金板、参照極には銀/塩化銀電極(SSE)を用いた。

Tiの開回路電位からカソード電位-1.0 V<sub>SSE</sub>(DC-1Vと記)、アノード電位+1.0 V<sub>SSE</sub>(DC+1Vと記)を30秒(s)、1800sで付与した。また、-1 V<sub>SSE</sub>と+1 V<sub>SSE</sub>の間の電位で周波数1Hzの正弦波を30s、1800s間負荷し交流(AC±1Vと記)をかけた。帯電電位により、ラミニンはTi電極に引き寄せられ、固定化される。電着後、試験片を取り出す際は、冷超純水ですすぎ、窒素ガス(99.9%)にて乾燥させた。

### (1) 電着によるラミニン電着の条件の検索

#### 電着のpHの影響

pHを4、7、9に調整した0.1v/w%ラミニン含有電解液、DC-1V、電着時間30sにて電着後、電解液中の残存ラミニン量をELISAにて測定し、Ti板へのラミニン付着量を検討した。

図1は各pHにおける電解液中の残存ラミニン量である。この結果よりpH4が他のpHよりも多くのラミニンを付着させたことが分かった。

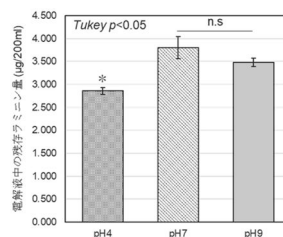


図1. 各pHにおける電解液中の残存ラミニン量

#### 電着の電位と時間の影響

pH4の一定条件下で各電位にて30sおよび1800s間電着を行い、と同様にELISAを用い、各条件におけるTi板へのラミニン付着量を検討した。

電着時間に関係なく、総じてAC±1V、DC+1VがDC-1Vより付着量が多かった(図2)。本実験では、ラミニンを生体模倣で金属に電着固定させ、金属を生体機能化させることから、ラミニンのN末端をTiに電着固定させなければならない(図3)。そのため、引き続きの実験ではDC-1Vを用いることとした。

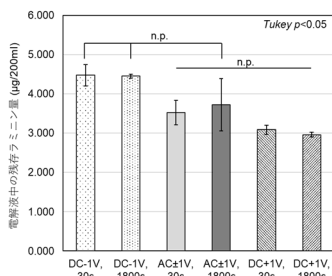


図2. 各条件における電解液中の残存ラミニン量

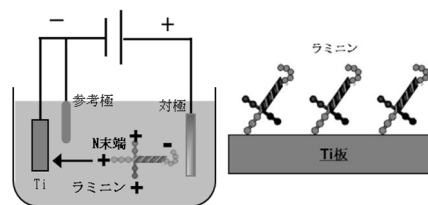


図3. (左) 負電位に帯電した場合のラミニンのN末端をTiに電着させるため負電位に帯電させた模式図。(右) ラミニンを生体模倣で金属に電着させた模式図

pH4、DC-1V、30s で Ti 表面へ電着させたラミニンは、蛍光染色、走査電子顕微鏡 (SEM)、走査型プローブ顕微鏡 (SPM) によって評価した。染色により Ti 板上にラミニンの付着があることは明らかであるものの、ラミニンが凝集体として散在して認められた。また、SEM 観察、AFM 観察でも同様であった (図 4 - 6)。

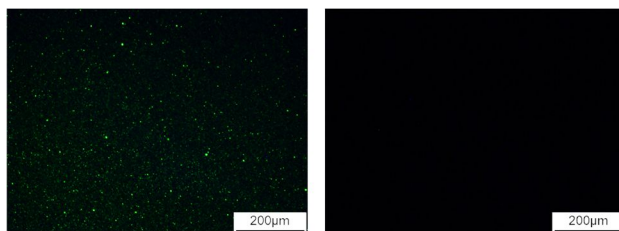


図 4 . (左) 抗 anti- 3B mAb F7 にて 蛍光染色された Ti 板に電着固定されたラミニン (緑色) (右) 対照 (抗体 (-))

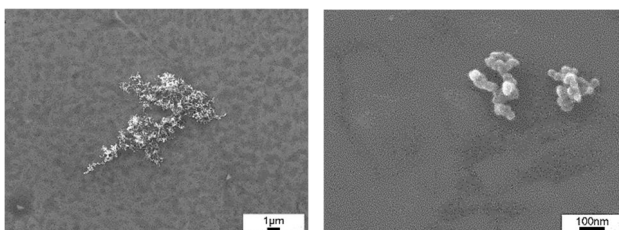


図 5 . S E M 像 Ti 板にラミニンが凝集体として 散在していた

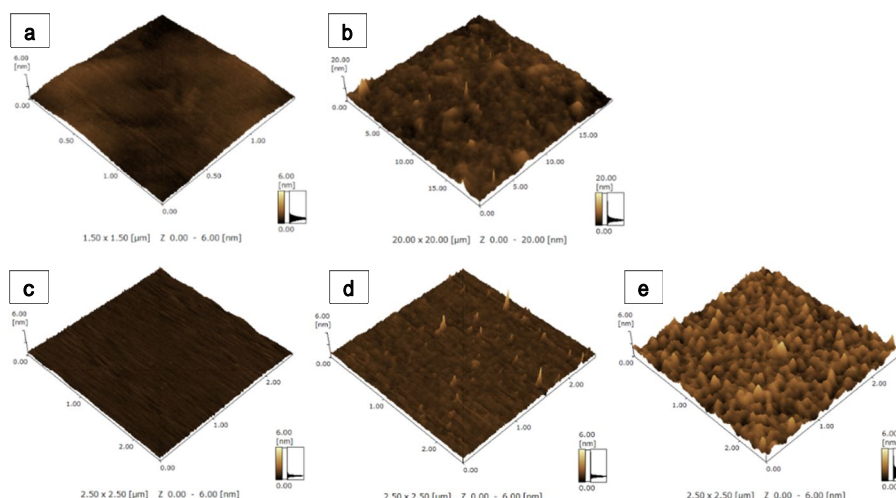


図 6 . A F M 像

(a) 鏡面研磨 Ti 板、(b) ラミニンを電着した Ti 板、

(c) 参考：マイカ

(d) 参考：マイカ上の 0.08 w/v ラミニン 24 時間浸漬後、

(e) 参考：マイカ上の 0.4 w/v ラミニン 24 時間浸漬後

マイカ上でラミニンは突出して認められ、濃度が濃くなると積み重なるかのように凹凸として認められた。このことから、チタン板上ではラミニンは散在して固定されていた (b)。

## (2) ラミニンに配向性を持たる電着の条件の検索

ラミニンが生体内では 27 度の配向性を持って配列していること、また、生体模倣から機能性を引き出すという観点から、回転電極を応用し電解液に流速環境を作りラミニンに配向性を持たせることを試みた。

作用極 (Ti 板) を回転数 0、200、400rpm で回転させ、流速を 0.1v/w% ラミニン含有電解液に起こさせた。DC-1V、30s でラミニンを電着させ、SPM、蛍光染色によって配向性を評価した。

回転が 200rpm の際、他の回転での電着よりもラミニンの固定が多く見られたものの、配向性は認められなかった (図 7)。また、ラミニンはチタン板上に散見される状態であった (図 7, 8)。

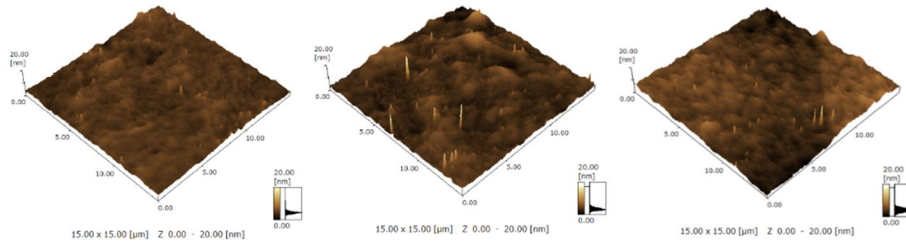


図7．回転電極を用いてラミニンを電着固定したTi板

(左)回転数 0rpm、(中央)回転数 200rpm、(右)回転数 400rpm

回転数 200rpm が一番多くラミニンが散在して認められるが、配向性は認められなかった

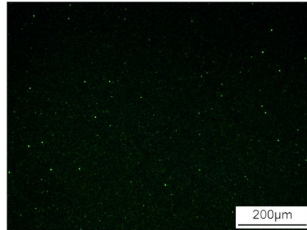


図8．回転数 200rpm にてTi板にラミニンを電着固定後、抗 anti-3B mAb F7 にて蛍光染色したところ、ラミニン(緑色)が散在して認められた

#### 4．研究成果

本研究は電着処理により、Ti表面にインプラントと歯肉の接着に必要な不可欠なラミニンを固定化させた。また、回転電極による流速環境で電着を行うことで、ラミニンに配向性をもたせた。

電位をかけない状態では、チタン表面では低 pH で+電荷の割合が多い。そこに直流負電位がかかるとチタン表面は-電荷が増える。また、ラミニンも正に帯電する傾向となり、双方が互いに引き寄せられ、固定化に相当であったと考えられた。

AC±1Vでは、負電位をかけた状態と正電位をかけた状態を交互に繰り返すことにより、表面電荷に-電荷が増加すること、そして、一部元の状態に戻る、つまり正の電荷に戻ることを1Hz(1分間に60回)という早いスピードで繰り返すことで、より負電位に近い表面状態になることが考えられる。さらに、ラミニンの+-の電荷が交流の負電位、正電位の両方に作用し電着されていく。そのため、+電荷だけを引き付けるDC-1Vより+-の両方の電荷を引き寄せるAC±1Vの方がより多くのラミニンを固定化したと考えられた。DC+1Vにおいては、ラミニンと対極が反応し、見かけ上ラミニンの電解液中の量が少なくなっていたと考えられ、そのことから相対的にTi板へのラミニンの固定量が多かったとみなされた可能性がある。

回転をかけることによって流速環境が生じ、ラミニンに傾ききをつけようとした(配向性を持たせる)。200rpmの回転を与えることでより多くのラミニンが電着固定される可能性が増え、固定化量が多く見受けられた。しかし、400rpmではラミニンの固定化が200rpmよりも少ないことから回転が速く、ラミニンの固定化を阻害したと考えられた。配向性の制御には、さらに条件を最適化する必要があるといえる。

今回、エリプソメーターによる被膜厚さの検討、X線光電子分光法(XPS)による表面分析の検討を試みたものの、ラミニンによる被膜ができていなかったこと、固定化の量が非常に少なかったことから結果を得ることができなかった(データ結果省略)。

以上から、本研究において金属を生体機能化するためラミニンをTi表面に電着固定化することができ、また、一定の条件下で流速をつけることで、配向は認められないもののラミニンを多く固定化することができた。今回、基板試料の作製、ラミニンの大きさによるその存在確認の困難さが大きく実験結果を左右させ、当初の実験体系を見直す必要性が研究期間途中で生じた。しかし、基本実験体系をリカバリーすることができ、再現性のある実験を遂行することができた。また、ラミニンの使用は高価なことから、より細かく厳密な条件を出して必要最小限の電着を行い広く応用していくべきであると思われた。

#### (参考文献)

- 【1】 Hayakawa T, et al., J CERAM SOC JAPAN. 2008;116(1):68-73
- 【2】 Kawabata S, et al., J Tissue Eng Regen Med. 2013;7(5):348-52
- 【3】 H Kamata, et al., Mater Trans. 2011;52:81-89

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------